特集

「バイオものづくり」のための共通基盤技術　6

# 植物における一過性発現による物質生産

## 感染応答機構を考慮したタンパク質生産

福澤徳穂　Noriho FUKUZAWA

植物の一過性発現系は，植物病原体の感染，増殖能力を利用して外来遺伝子を葉に導入し，抗体，抗原，酵素などの目的タンパク質を数日間で大量に発現させる技術である。しかし，同時に植物の病害抵抗性が誘導され，生産を制限する要因となり得る。本稿では，この課題の解決に向け，NEDO バイオものづくりプロジェクト「遺伝子組換え植物を用いた大規模有用物質生産システムの開発」において進めてきた“植物改変”について解説する。

### はじめに ～なぜ植物で有用タンパク質を生産するのか～

抗体，ワクチン抗原，酵素，サイトカインなどの多くは，生物学的活性を保持するために適切な立体構造を形成する必要がある。タンパク質によっては，ジスルフィド結合の形成，糖鎖付加，サブユニットの会合なども不可欠である。このため，これらの生産には，生細胞を利用する組換えタンパク質発現系による生産が適しており，求められる特性や用途などに応じて，大腸菌，酵母，哺乳類培養細胞などが従来から用いられてきた。植物も真核生物であり，小胞体およびゴルジ体を介する分泌経路を備えているため，タンパク質の折り畳み，ジスルフィド結合の形成，翻訳後修飾，会合，多量体形成などが可能である。1989 年には，遺伝子組換え植物で機能性抗体を発現できることが初めて報告され[1]，それ以降，植物を新たなタンパク質発現系として利用する研究開発が世界的に進められてきた。植物を用いた目的タンパク質の生産には，ヒトや動物に感染する病原体が製造工程に混入するリスクを低減できること，培養系と比べて初期設備投資を抑えやすく，植物個体数や栽培棚数を増やすことで生産規模を柔軟に拡張できること，さらに一過性発現系を利用することで，遺伝子導入から目的タンパク質の回収までを短期間で行えるなどの利点がある。カーボンリサイクルの観点では，植物は光合成によって $CO_2$ を固定し，有機物を生産する光独立栄養生物である。外部から有機炭素源を供給する必要がある従属栄養生物による生産系とは異なるこの特性も，植物生産系が有する潜在的な利点の 1 つである。

ふくざわ・のりほ
国立研究開発法人産業技術総合研究所　主任研究員
〔経歴〕2004 年筑波大学大学院農学研究科応用生物化学専攻博士課程修了，博士（農学）。同年産業技術総合研究所特別研究員を経て，05 年同研究所入所，13 年より現職。23 年より大阪大学生物工学国際交流センター招聘准教授を兼任。〔専門〕植物分子工学，環境医学。
E-mail: noriho-fukuzawa@aist.go.jp



### 一過性発現によるタンパク質生産と *Nicotiana benthamiana*

一過性発現系には，植物ウイルスベクター法，アグロインフィルトレーション法，ならびに両者を組み合わせたアグロインフェクション法などがある（図 1）。アグロインフェクション法では，植物ウイルス由来の発現カセットを T-DNA に組み込み，アグロバクテリウムを介して植物細胞へ導入する。植物ウイルスベクター法およびアグロインフェクション法は，植物ウイルスの自律複製能を利用しており，ウイルスの増殖に伴って目的タンパク質が生産されるため，高い発現量が得られる[2]。一方，これらの方法と比べて発現量は多少低いものの，汎用性の高さから最も広く用いられているのがアグロインフィルトレーション法である。近年では，強力なプロモーターの利用や目的遺伝子のコドン最適化など，アグロバクテリウムに導入する発現ベクターの改良も進められている。

アグロバクテリウムを利用するアグロインフィルトレーション法およびアグロインフェクション法では，図 2 に示す一連の工程によって目的タンパク質を生産する。

まず，目的遺伝子を T-DNA 領域に配置した植物発

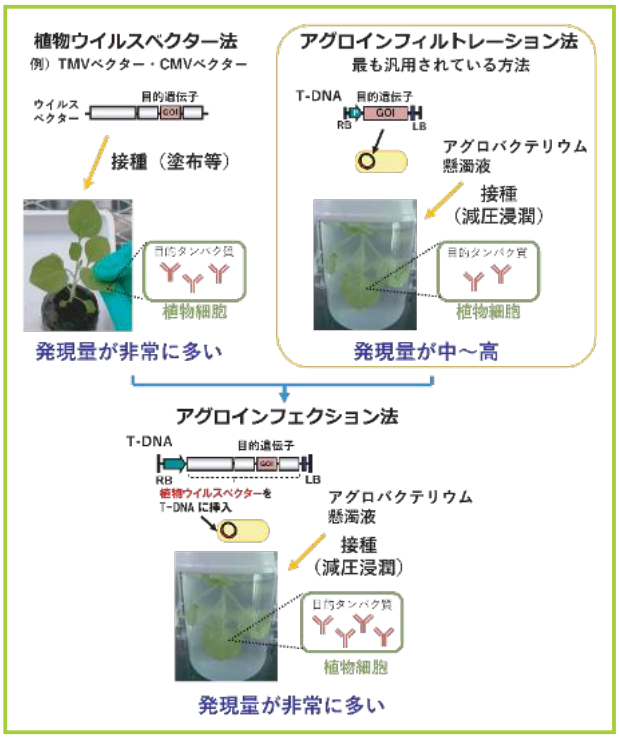



**図1　有用物質生産のための一過性発現系**

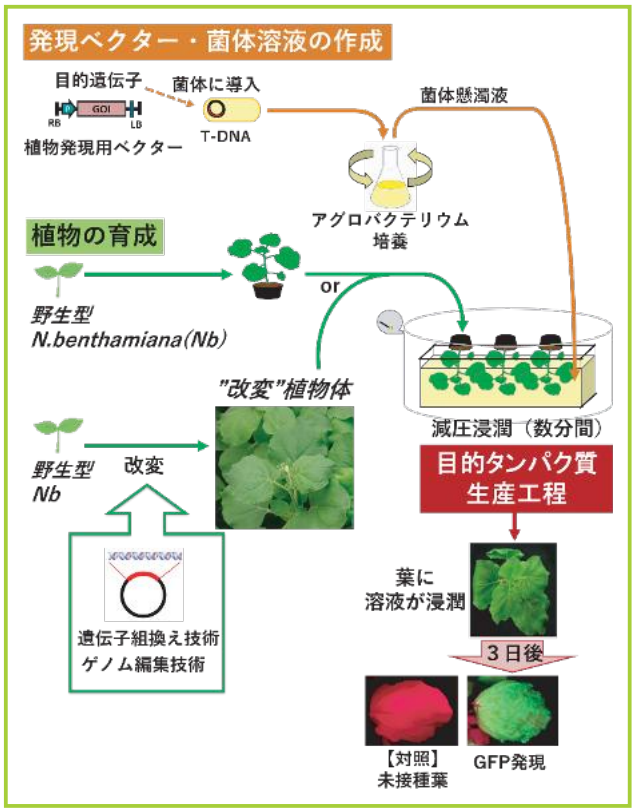



**図2　アグロバクテリウムを用いた目的タンパク質の生産方法**

現用ベクターを構築し，アグロバクテリウムに導入する。次に菌体を培養し，調製した菌体懸濁液を減圧処理によって葉の細胞間隙へ浸潤させる。細胞内に運ばれたT-DNAから目的遺伝子が一過的に転写・翻訳され，多くの場合，目的タンパク質は，遺伝子導入後3～7日程度で葉に蓄積する。葉組織に蓄積した目的タンパク質は，葉から抽出した後，精製して利用する。この一連の工程に用いる宿主植物としては，ナス科植物の *Nicotiana benthamiana*（*N. benthamiana*）が事実上の標準となっている。その理由として，植物体全身への減圧浸潤が可能であること，アグロバクテリウムによる感染成立が容易であること，さらに多様な植物ウイルス（ベクター）の感染・増殖を許容することが挙げられる。このように，*N. benthamiana* は，一過性発現に適した複数の特性を備えている。

## 一過性発現系の生産性を制限するボトルネック

前述のように，多様な植物病原体に対して高い感染感受性を示す *N. benthamiana* においても，病原微生物の侵入に応答して防御反応が誘導される。アグロインフィルトレーションでは，減圧浸潤操作による物理的ストレス応答が生じると考えられる。さらに，アグロバクテリウム由来の菌体成分が細胞膜に局在するパターン認識受容体に認識されると，パターン誘導免疫（PTI）が活性化され，その下流では，活性酸素種の生成やMAPキナーゼカスケードの活性化などが起こる。これに伴って防御関連遺伝子の転写プログラムが再編成され，サリチル酸などの病害抵抗性を制御する植物ホルモンの生合成と細胞内蓄積が進む。サリチル酸はアグロバクテリウム側にも直接作用し，T-DNAの移行に必要な *vir* 遺伝子群の誘導を抑制することが報告されている。一方，植物細胞内では，蓄積したサリチル酸がNPR1を中心とするサリチル酸受容体に結合すると，シグナル伝達系を活性化し，防御関連遺伝子の発現が誘導されることによって，局所的な防御応答を増幅する。さらに，サリチル酸経路はN-ヒドロキシペコリン酸（NHP）を介するシグナル経路と協調し，遠隔組織における免疫プライミングおよび全身獲得抵抗性の成立に寄与する。これらの宿主応答は，図2に示す一過性発現系において，非病原化したアグロバクテリウムを用いた場合においても誘導される。その結果，アグロバクテリウムの定着，*vir* 遺伝子の発現，T-DNA移行，さらには導入遺伝子の発現が制限されることがある。また，植物ウイルスベクターを併用する系では，ベクターRNAの複製や細胞間移行も抑制され得る。これらの作用により，遺伝子導入効率やベクターの増幅効率が低下し，最終的に目的タンパク質の蓄積量が減少すると考えられる（図3左）。さらに，宿主防御応答が過剰に活性化すると，局所的な細胞死や葉組織の壊死が引き起こされる。これにより，生産に利用で

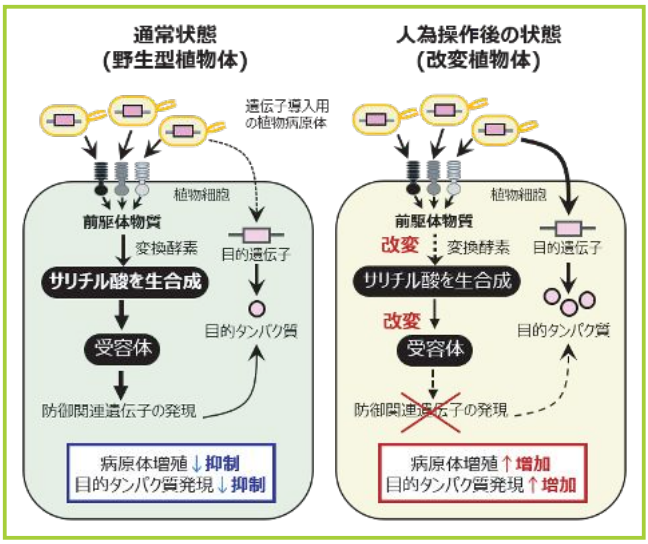



**図3　有用タンパク質の一過性発現量増産のための植物改変戦略**

きる葉組織量が減少するとともに，目的タンパク質の収量や品質が低下して，葉組織における安定生産そのものが困難となる。

筆者らは，一過性発現系の生産性をさらに高めるためには，病害抵抗性を支える宿主防御応答のうち，目的タンパク質の生産を制限する反応を植物の生育を損なわない範囲で適度に抑制することが重要であると考えた。そこで，図3右に示す戦略に基づき，2020年からNEDOバイオものづくりプロジェクト[3]において，遺伝子組換え技術，ゲノム編集技術を用いた改変植物の作出に取り組んでいる[4]。

## 遺伝子組換え/ゲノム編集による改変植物の目的タンパク質生産への利用

改変対象の植物種には，一過性発現系の標準的な発現宿主である*N. benthamian*を選定した。本種は，植物病理学のモデル植物として広く利用されており，病原体の認識から防御応答の誘導，病害抵抗性の成立に至る分子機構に関する知見が蓄積されている。また，2023年には，高精度な全ゲノム配列が報告され，5万7583個の高信頼度遺伝子配列が予測された[5]。本種は，異質倍数体であるため，多くの遺伝子について，祖先ゲノムに由来する相同遺伝子コピー（ホメオログ）が存在する。一方，相同性の高い配列領域を標的とすることにより，複数のホメオログの発現を同時に抑制したり，同時に変異を導入したりすることも可能である。しかし，*N. benthamiana*の安定改変植物を作出するには，植物組織培養を介した遺伝子導入と植物体の再分化が必要であり，初代改変植物体を得るまでに通常，半年以上を要する。さらに，改変形質の後代への継承を確認し，優良系統を選抜・固定するには，複数世代にわたる育成と評価が必要となる。CRISPR-Cas9によるゲノム編集では，目的変異のホモ接合化と系統固定に加え，導入したCas9遺伝子を分離除去する必要があり，その確認を含む後代解析にも時間を要する。そこで，改変植物体の作出に先立つスクリーニングとして，ウイルス誘導性ジーンサイレンシング（VIGS）法などにより，候補遺伝子の発現を一過的に抑制し，その際の目的タンパク質の発現量などを評価することが有効である。

筆者らの育種事例では，サリチル酸の生合成経路上にある変換酵素のフェニルアラニンアンモニアリアーゼ（PAL）の発現を恒常的に抑制した遺伝子組換え植物体を作出した。さらに，サリチル酸シグナル伝達経路上の受容体（NPR1）を標的とし，CRISPR-Cas9によってホメオログ配列に欠失変異を導入したゲノム編集植物体も作出した。これらの改変植物体を用いて，複数の目的タンパク質を前述の各一過性発現方法（図1）により発現させたところ，改変前の野生型植物体と比較していずれの手法においても目的タンパク質の発現量が約2〜5倍増加した[6]。この結果は，発現宿主の改変が目的タンパク質の生産性を向上させる有効な手段となることを示している。

## おわりに

従来から組換えタンパク質の生産に用いられてきた大腸菌やCHO細胞では，高い生産性を示す細胞株が開発され，実製造で利用されている。植物発現系においても，工業用酵素，研究用試薬，化粧品原料などの商業生産への利用が進みつつある。さらに，COVID-19パンデミックを契機として，短期間で目的タンパク質を生産できる植物一過性発現系の迅速性が改めて注目された。医薬品分野においても，*N. benthamiana*の一過性発現系によるヒト用および動物用ワクチンの承認例も報告されている。植物発現系においても，本稿で紹介したような宿主植物の改変を進め，実製造に適用可能な高発現宿主系統を確立することにより，Plant-made Pharmaceutical（PMP）の社会実装が一層加速すると期待される。

1）A. Hiatt, R. Cafferkey, B. Katherine, *Nature* **1989**, *342*, 76.
2）福澤德穂，松村　健，生物工学会誌 2013, *91*, 361.
3）NEDO「カーボンリサイクル実現を加速するバイオ由来製品生産技術の開発」，プロジェクト概要，https://www.nedo.go.jp/activities/ZZJP_100170.html（2026年8月現在）.
4）福澤德穂，バイオサイエンスとインダストリー **2025**, *83*, 262.
5）K. Kurotani, H. Hirakawa, K. Shirasawa, Y. Tanizawa, Y. Nakamura, S. Isobe, M. Notaguchi, *Plant Cell Physiol*. **2023**, *64*, 248.
6）福澤德穂，厚見　剛，田坂恭嗣，松村　健，第43回 日本植物バイオテクノロジー学会（鳥取）大会　講演要旨，**2026**.

© 2026 The Chemical Society of Japan